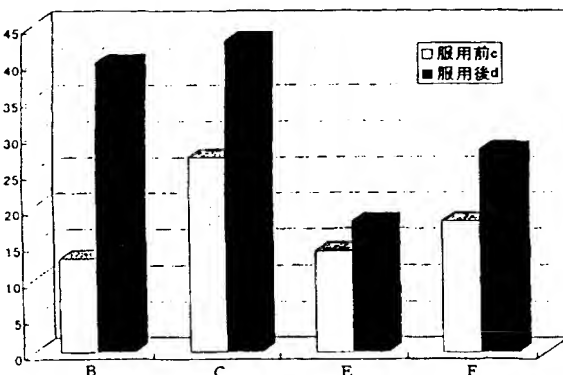


(51) 国際特許分類7 A61K 35/84, A61P 35/00, 37/04 // A23L 1/212, 1/28	A1	(11) 国際公開番号 WO00/32212 (43) 国際公開日 2000年6月8日 (08.06.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06616 (22) 国際出願日 1999年11月26日 (26.11.99) (30) 優先権データ 特願平10/353927 1998年11月27日 (27.11.98) JP 特願平10/353928 1998年11月27日 (27.11.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 小林製薬株式会社 (KOBAYASHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP] 〒541-8507 大阪府大阪市中央区道修町4-3-6 Osaka, (JP) 長岡 均 (NAGAOKA, Hitoshi) [JP/JP] 〒270-1152 千葉県我孫子市寿2丁目22番13号 Chiba, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 浅野健治 (ASANO, Kenji) [JP/JP] 松田由紀子 (MATSUDA, Yukiko) [JP/JP] 〒532-0035 大阪府大阪市淀川区三津屋南3-13-35 小林製薬株式会社内 Osaka, (JP) 田島 裕 (TAJIMA, Yutaka) [JP/JP] 〒849-0935 佐賀県佐賀市八戸溝3丁目10番511号 Saga, (JP)		(74) 代理人 社本一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.) 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo, (JP) (81) 指定国 CA, CN, GB, KR, SG, US 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: LAK ACTIVITY POTENTIATOR ORIGINATING IN SHIITAKE MUSHROOM HYPHAE EXTRACT AND LAK ACTIVITY POTENTIATING PREPARATIONS CONTAINING THE SAME (54) 発明の名称 シイタケ菌糸体抽出物由来のLAK活性増強物質およびこれを含むLAK活性増強用製剤 <div data-bbox="482 1266 1169 1814">  <p>a ... LAK ACTIVITY (%)</p> <p>b ... SUBJECT</p> <p>c ... BEFORE INTAKE</p> <p>d ... AFTER INTAKE</p> </div> (57) Abstract An immunopotentiator and immunopotentiating preparations which show little side effects and can be obtained economically. An LAK activity potentiator containing a shiitake <i>Cortinellus shiitake</i> mushroom hyphae extract.		

本発明の目的は、副作用が少なく安価に入手可能な免疫賦活物質および免疫療法製剤を提供することである。

本発明によれば、シイタケ菌糸体抽出物を含むLAK活性増強物質及びこれを含むLAK活性増強用製剤が提供される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SS	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TR	トルコ
CC	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

明細書

シイタケ菌糸体抽出物由来のLAK活性増強物質およびこれを含むLAK活性増
5 強用製剤

技術分野

本発明は、免疫の分野に関する。本発明は、免疫活性を高める物質およびこれ
を利用する治療製剤に関し、さらに詳しく述べれば、LAK活性増強に有用な物
10 資およびそれを利用するLAK活性増強用製剤に関する。

背景技術

生体の防御機構としての免疫機構としては、細胞性免疫と体液性免疫とがある。
体液性免疫は、抗体が関与して発現する免疫反応をいう。細胞性免疫は細胞が直
15 接標的に作用して発現される免疫反応をいう。

この細胞性免疫反応の担い手は主としてリンパ球であり、抗原は細胞上の物質
であることが多い。細胞性免疫は、腫瘍、細胞内寄生体、ウイルスに対する免疫
反応、移植、ある種の薬物アレルギー、一部の自己免疫疾患にも関与していると
考えられている。一般には、特異的な反応が多いが、非特異的に作用するものも
20 ある。

例えば、腫瘍免疫学においては、腫瘍細胞が腫瘍抗原を有することが知られて
いる。即ち、腫瘍細胞に特異な抗原（TSA：Tumor Specific Antigen）、また
は正常細胞にもごく微量存在するが細胞の癌化に伴いその発現が増強される腫瘍
関連抗原（TAA：Tumor Associated Antigen）の存在がわかっている。

25 このような腫瘍抗原は自己の細胞の変異に伴って生じる遺伝子自体またはその
発現の変化により発現される。抗原性が異常な腫瘍細胞の治療法としては、免疫
療法が一般的に用いられており、腫瘍抗原で免疫したり、免疫機能を増強する薬
剤が用いられる。一般に、腫瘍細胞を破壊する活性は正常細胞よりもNK（ナチ
ュラルキラー）細胞の方が高く、またNK細胞の活性も免疫療法により増強され

ることが知られている。NK細胞は正常個体中にも存在する細胞障害性リンパ系細胞であり、腫瘍細胞、ウイルス感染細胞等に対してMHC抗原に拘束されずに障害活性を示すことが知られているが、最近では、NK細胞でも殺傷し得ない腫瘍細胞の存在も明らかとなった。

- 5 米国NCIのS. Rosenbergは、末梢リンパ球をインターロイキン2 (IL-2) と共に培養すると、自家ガンを含む広い範囲の標的ガン細胞に対して細胞障害性を示すキラー細胞を誘導することができ、このキラー細胞によればNK細胞では殺傷不可能なガン細胞をも殺傷することができることを発見した（特開昭 62-116518号参照）。このキラー細胞は、リンホカイン活性化キラー細胞（LAK細胞、Lymphokine Activated Killer Cell）と命名された。LAK細胞は、細胞学上は均一な集団ではなく、NK細胞系やキラーT細胞系の細胞集団であることが知られている。

- 15 近年は、患者由来の末梢リンパ球を細胞培養系中でIL-2を用いて活性化した後、抗腫瘍活性を示すLAK細胞を再び患者体内に移入する、養子免疫の方法が試みられている（LAK療法）。このようなLAK細胞の繰り返し投与により末期癌の縮小あるいは増殖抑制例が報告されている。しかしながら、IL-2を使用したLAK療法には、多量の白血球を分離することによる肉体的負担、分離した白血球細胞を大量培養したり高価なIL-2を使用したりするための経済的負担が大きいことなど、種々の問題点がある。また、IL-2投与により重篤な副作用が伴うことが多い。

- 25 具体的には、IL-2を用いたLAK養子免疫療法を行う場合、全身倦怠、悪寒、発熱、低アルブミン、貧血、好酸球増加などの症状を副作用として生じ、これらの副作用はIL-2を単独で用いた場合よりも強いことが知られている。さらに注目すべきは、重大ないくつかの副作用の発現に、LAK細胞の正常細胞に対する傷害活性が関与している可能性が高いことである。このようなLAK細胞による造血幹細胞傷害により、貧血や血小板減少が生じるほか、リンパ球、マクロファージや血管内皮細胞に対する*in vitro*傷害も生じることも報告されている。また、IL-2は経口投与による吸収が悪く、現在のところ、直接投与に際しては注射投与が主流である。

そこで、このような欠点を補う物質、特に IL-2 を用いることなくリンパ球の LAK 活性を増強することのできる物質、あるいはそうした物質を含む薬剤の開発が望まれている。

抗癌剤は一般に癌細胞の異常な増殖性を標的としており、阻害対象により分類すれば、核酸合成阻害剤として、例えばアルキル化剤、核酸合成基質アナログ、抗生物質、ステロイドホルモン等があり、有糸分裂阻害剤として植物アルカロイド等がある。

しかしながら、これらの抗癌剤は、同時に増殖性の正常細胞である骨髄、胃腸管上皮、毛嚢に対して著しい副作用を示す。即ち、投与形態に拘わらず、一般的な症状として、悪心、嘔吐、口腔および小腸の潰瘍、下痢、脱毛、血液の有効成分産生の低下をきたす骨髄抑制等を引き起こす。

従来から、細菌類あるいは食品等が抗癌作用を有することが知られている。これらの抗癌作用を有する細菌類あるいは食品等は副作用が少なく安全であることから、これらの細菌類あるいは食品等からの抗癌作用物質の探索が試みられてきた。これまでに細菌類により癌を制圧しようとする多くの試みが行われており、例えばセラチア菌と溶連菌の培養濾液を用いた Coley's トキシン (1964)、BCG による白血病治療 (Mathe, G., Adv. Cancer Res., 14, 1, 1971) およびモルモットにおける癌腫瘍の退縮 (Zbar, B., et al., J. Natl. Cancer Inst., 48, 831, 1971)、および酵母壁多糖体の投与によるサルコーマ 180 等の移植癌に対する有効性等が報告されている。

特に、多糖体に関しては、酵母グルカン、酵母マンナン、その他の菌体の多糖体、地衣類および担子菌類の多糖体における抗癌効果について多くの研究が行われてきた。これらのうちで抗癌免疫増強薬として現在市販されているものとしては、担子菌類のサルノコシカケ科のカワラタケ培養菌糸体由来のクレスチン (呉羽化学、三共製薬：宿主の免疫機能賦活剤) およびシイタケ多糖体のレンチナン並びにスエヒロタケ多糖体などがある。

また、シイタケ (*Lentinus edodes*) は日本並びに中国を代表する食用キノコであって日本では約 300 年も前から人工栽培が行われてきたが、その薬理効果並びに薬効成分が最近解明されつつあり、例えば、ラット・マウスにおける大腸

および肝臓等の移植腫瘍細胞の増殖抑制効果（Sugano, N, et al., Cancer Letter, 27: 1, 1985；鈴木康将ら、日本大腸肛門病会誌、43: 178, 1990）およびマイトジェン効果（Tabata, T. et al., Immunopharmacology, 24: 57, 1992；Hibino, et al., Immunopharmacology, 28: 77, 1994）などが報告されている。

5

発明の開示

本発明者らは、副作用が少なくて安価に入手可能な免疫療法剤を提供すべく、シイタケの持つ免疫賦活活性、抗腫瘍活性および／または抗癌活性に着目した。

10 本発明者らは、シイタケの食用形態である子実体の前の形態である菌糸から抽出された成分中に、子実体をはるかに凌ぐ免疫賦活活性並びに抗腫瘍活性および／または抗癌活性があることを見だし、しかも当該抽出物が、LAK活性増強活性を有することを見だして、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明の第1の側面によれば、シイタケ菌糸体抽出物を含有するLAK活性増強物質が提供される。

15 「LAK活性」とは、NK活性を担うリンパ球では認識できない腫瘍を攻撃でき、かつ自己の正常細胞にはほとんど影響を与えない細胞障害性Tリンパ球の示す活性を意味する。「LAK活性増強」とは、こうしたLAK活性を強めることであり、直接的あるいは間接的にリンパ球からLAK細胞を誘導するあるいはすでに存在するLAK細胞の活性をさらに高めること等を意味する。

20 LAK活性を増強することで、LAK細胞の抗腫瘍活性を高めることができるが、これは細胞性免疫系の向上を導く。したがって、抗腫瘍活性の向上を期待する治療以外にも、免疫系の向上を目的とする治療に用いることができる。

本発明のLAK活性増強物質を、末梢血由来のリンパ球に作用させることによりLAK活性を増強させてもよい。末梢血由来のリンパ球に直接作用させてもよく、その場合には、シイタケ菌糸体抽出物の濃度が約 10^6 個のリンパ球に対して $1\mu\text{g}$ 以上あるいは末梢血 1ml に対して $1\mu\text{g}$ 以上であることが好ましい。
25 本発明のLAK活性増強物質は、IL-2の代わりにLAK療法に使用してもよい。

本発明のLAK活性増強物質は、シイタケ菌糸体抽出物そのものであってもよ

く、あるいはシイタケ菌糸体抽出物以外の物質をさらに含んでもよい。シイタケ菌糸体抽出物のLAK活性増強を損なわない範囲であれば、任意の物質を含むことができる。

5 本発明のLAK活性増強物質は、免疫賦活活性並びに抗腫瘍活性および／または抗癌活性を有する他の物質等と混合して併用してもよい。

本発明の第2の側面によれば、シイタケの菌糸体抽出物を含むLAK活性増強物質を含有するLAK活性増強用製剤が提供される。

10 本発明のLAK活性増強用製剤は、シイタケ菌糸体抽出物そのものであってもよく、あるいは、シイタケの菌糸体抽出物を含むLAK活性増強物質および薬学上許容可能な担体を含有する医薬または獣医薬用の製剤であってもよい。

本発明のLAK活性増強用製剤は、経口投与用であってもよく、あるいは注射または経皮投与用であってもよい。

本発明のLAK活性増強用製剤は、食品、飲料、または飼料であってもよい。

15 本発明のLAK活性増強用製剤は、腫瘍および／または癌の治療に用いてもよい。本発明のLAK活性増強用製剤は、LAK細胞を誘導するものであるから、特定の腫瘍細胞を特異的に傷害するものではなく、上皮性、非上皮性を問わず各種腫瘍の治療に対して使用することができる。

20 また、腫瘍や癌以外の治療に用いてもよく、例えば、免疫系の向上を目的とする治療に用いることができる。具体的には、放射線照射等の免疫系低下を生じる治療や事故、あるいは自己免疫疾患、感染症等により免疫系が低下している状態を改善するために用いることができる。

本発明のLAK活性増強用製剤は、各種疾病の予防薬として使用することもできる。例えば、腫瘍および／または癌を予防するため、あるいは細菌またはウイルス性の感染症を予防するために投与してもよい。

25 さらに、本発明のLAK活性増強製剤は、例えば、免疫賦活剤等の抗腫瘍剤および／または抗癌剤、抗生剤、鎮痛剤、抗炎症剤等の他の薬剤と混合して併用してもよい。

本発明の第3の側面によれば、こうしたLAK活性増強用製剤の有効量を投与する、腫瘍および／または癌の治療方法が提供される。

さらに、本発明の腫瘍および／または癌の治療方法は、例えば、他の薬剤治療方法、外科的処置、放射線照射、温熱療法等の他の治療方法と併用してもよい。

本発明の第4の側面によれば、腫瘍および／または癌の治療に用いる医薬品を得るための、LAK活性増強用物質の使用が提供される。

- 5 腫瘍および／または癌の治療に用いる医薬品を得るために、本発明のLAK活性増強用物質を、免疫賦活活性並びに抗腫瘍活性および／または抗癌活性を有する他の物質と混合して使用してもよい。

図面の簡単な説明

- 10 図1は、シイタケ菌糸体抽出物を末梢血に直接添加した場合のLAK活性の増強効果をIL-2と比較した棒グラフである。

図2は、シイタケ菌糸体抽出物を末梢血に直接添加した場合の、シイタケ菌糸体抽出物の濃度変化に伴うLAK活性の変化を示す棒グラフである。

- 15 図3は、クレスチンを末梢血に直接添加した場合のLAK活性を示す棒グラフである。

図4は、シイタケ菌糸体抽出物を経口投与する前と後の末梢リンパ球のLAK活性を示す棒グラフである。

発明を実施するための好ましい形態

- 20 本発明による、LAK活性増強物質に含まれるシイタケ菌体抽出物とは、シイタケ菌を固体培地上で培養して得られる菌糸体、好ましくは菌糸体を含む固体培地を水および酵素の存在下で粉碎、分解して得られる抽出物を言う。

シイタケ菌糸体抽出物は、好ましくは以下の方法により得られたものを使用するが、特にこれに限定されるものではない。

- 25 即ち、バカス（サトウキビ濃度がしぼりかす）と脱脂米糠を基材とする固体培地上にシイタケ菌を接種し、次に菌糸体を増殖させて得られる菌糸体を含む固体培地を12メッシュ通過分が約30重量%以下となるように解束する。

この解束された固体培地に水およびセルラーゼ、プロテアーゼまたはグルコシダーゼから選択される酵素1種またはそれ以上を約30～55℃の温度に保ちな

がら、前記固体培地に添加すると共に、前記固体培地を前記酵素の存在下で粉碎、搗潰してバカス繊維少なくとも70重量%以上が12メッシュ通過分であるようにする。次に80～100℃までの温度に加熱することにより酵素を失活させると共に滅菌し、得られた懸濁状液体を濾過することによりシイタケ菌糸体抽出物を得る。

得られたシイタケ菌糸体抽出物を、そのまま本発明のLAK活性増強物質あるいはLAK活性増強用製剤に用いてもよいが、これを濃縮、凍結乾燥して粉末として保存して、使用時に種々の形態で使用するのが便利である。凍結乾燥して得られる粉末は褐色粉末であり、吸湿性があり、特異な味と匂いを有する。

- 10 こうして得られたシイタケ菌糸体抽出物を含むLAK活性増強物質（シイタケ菌糸体抽出物そのままでもよい）を、治療対象の腫瘍免疫活性増強のために、LAK療法においてIL-2の代わりに使用してもよい。

- 15 LAK療法は、一般には、治療対象から得たリンパ球をIL-2と共に組織培養してリンパ球からLAK細胞を誘導し、そして治療対象の体内に戻す工程からなる。治療対象に戻す工程においてIL-2を併用投与（直接投与）する場合もある。

- 20 本発明のシイタケ菌糸体抽出物を含有するLAK活性増強物質は、治療対象（患者、患畜等）のリンパ球と共に組織培養してLAK細胞を誘導することも可能であり、培養したリンパ球を治療対象に戻す工程において治療対象に併用投与（直接投与）することも可能である。他の抗腫瘍剤および／または抗癌剤と併用しても支障はない。

本発明のシイタケ菌糸体抽出物を含有するLAK活性増強物質は、そのまま治療対象から採取した末梢血に対して直接添加してもよいが、添加の前にアセトンによる無菌処理を行うことが好ましい。

- 25 本発明のシイタケ菌糸体抽出物を含有するLAK活性増強物質を、治療対象から採取した末梢血に直接添加する際の濃度は、好ましくはシイタケ菌糸体抽出物として $1\mu\text{g}/10^6$ リンパ球～ $1\text{mg}/10^6$ リンパ球であり、さらに好ましくは $10\mu\text{g}/10^6$ リンパ球～ $100\mu\text{g}/10^6$ リンパ球であり、特に好ましくは $10\mu\text{g}/10^6$ リンパ球～ $50\mu\text{g}/10^6$ リンパ球である。末梢血1

ml に対する投与量は、末梢血中のリンパ球の割合などにも影響されるが、およそ、 $1\mu\text{g}\sim 2.5\text{mg}$ 、好ましくは $10\mu\text{g}\sim 250\mu\text{g}$ 、さらに好ましくは、 $10\mu\text{g}\sim 125\mu\text{g}$ である。

- 5 本発明のシイタケ菌糸体抽出物を含有するLAK活性増強物質を含有するLAK活性増強用製剤は、治療対象の腫瘍免疫活性増強のために、治療対象に直接投与することにより、IL-2を用いたLAK療法に匹敵する効果を提供できる。

- 10 治療対象である患者あるいは患畜等に直接投与することで、治療対象のLAK細胞を誘導できれば、多量の白血球分離に対する肉体的負担や、大量培養に関する経済的負担を軽減することができる。さらには、治療対象から血液を分離してから戻すまでの汚染の危険性も軽減できる。

本発明のLAK活性増強用製剤の投与方法としては、治療対象に対する負担などを考慮すると、経口投与が最も好ましいが、特にこれに限定されない。血管内投与、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与等の注射投与の他、経皮投与、経鼻投与、経腸投与なども可能である。

- 15 本発明のLAK活性増強用製剤の剤型としては、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、粉薬、溶液剤、シロップ剤、注射剤、クリーム、軟膏、貼薬、スプレー、座薬等が例示されるが、これらに限定されない。

- 20 本発明のLAK活性増強用製剤に任意に混合可能な薬学上許容できる担体としては、当業界において公知の賦形剤（例えば、乳糖、ブドウ糖、デンプン、結晶セルロース等）、結合剤（デンプン、ゼラチン、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン等）、崩壊剤（デンプン、カルボキシメチルセルロースカルシウム、カルボキシメチルスターチ等）、滑沢剤（タルク、ステアリン酸塩等）、コーティング剤（白糖、タルク、ゼラチン等）等があり、さらに各種の光沢化剤、着香剤、着色剤、矯味剤、溶解補助剤、安定化剤、懸濁剤、吸収促進剤等を目的に応じて加えてもよいが、これらに限定されない。また、注射剤として使用する場合は、この分野において慣用されている各種希釈剤（例えば、水、エチルアルコール等）を使用できる。
- 25

本発明のLAK活性増強用製剤の投与ルート、投与量、投与回数等は、治療対象の年齢、体重、症状等を考慮して決定される。

本発明のLAK活性増強用製剤に含まれるシイタケ菌糸体抽出物は、古くから食品として使用されてきたものであり、極めて安全である。したがって、投与量を厳しく制限する必要はないが、通常はシイタケ菌糸体抽出物粉末に換算して、1日2～3回程度に分けて1回100mg～10000mg、さらに好ましくは1日3回に分けて1回500mg～5000mg、特に好ましくは1日3回に分けて1回1000mg～1500mgである。さらに、他の薬剤、例えば、他の免疫賦活剤等の抗腫瘍剤および／または抗癌剤、抗生剤、鎮痛剤、抗炎症剤等と併用して投与しても支障はない。

本発明のLAK活性増強用製剤は、食品の形で提供することもできる。好ましい食品の形態としては、粉末、顆粒、ペースト状、ゼリー状などが挙げられる。さらに顆粒等にする場合には、甘味を加えるため、乳糖などの糖類を加えることが望ましい。また、本発明のLAK活性増強用製剤は、飲料の形で提供することもできる。このような食品または飲料には、シイタケ菌糸体抽出物の他に、ビタミン剤、カルシウムなどの無機成分、アルコール類、ポリフェノールなどの消臭成分などを追加してもよい。この食品または飲料は、特定保健用食品、病者用食品等の範疇にあるものでもかまわない。

本発明のLAK活性増強用製剤は、飼料としてまたは飼料への添加剤の形で提供することもできる。家畜の飼料としてまたは飼料への添加剤として本発明のLAK活性増強用製剤を使用することにより、家畜に発生する腫瘍および／または癌を治療または予防し、あるいは家畜に対する細菌またはウイルス性の感染症を治療または予防することができる。

その結果、家畜について現在使用されている治療薬、例えば抗生物質などの使用量を減少することができ、それに伴って飼育コストを低下することができる。さらに、抗生物質を投与したために生産物を出荷できない期間を、より短くできるというさらなる効果もある。

本発明のLAK活性増強物質によるLAK活性増強は、例えば、高木らの方法に従い（臨床免疫、19：245－249，1987）、次の工程により確認することができるが、これに限定されない。

LAK活性試験

LAK 活性の測定は、 ^{51}Cr 放出アッセイ法、 $[\text{}^3\text{H}]$ ウリジン法などの方法により行うことができる。簡便性および客観性の観点から、 ^{51}Cr 放出アッセイを使用することが好ましい。

5 ^{51}Cr 放出アッセイは、LAK 活性増強物質で処理されたリンパ球から誘導された LAK 細胞による標的細胞傷害活性を *in vitro* において測定する方法の一つであり、以下の工程からなる。

(i) 標的細胞に ^{51}Cr で標識したクロム酸ナトリウムを添加することにより標的細胞を標識すること；

(ii) 標識された標的細胞を、誘導された LAK 細胞と反応させること；

10 (iii) LAK 細胞により破壊された標的細胞が細胞培養上清中に放出する ^{51}Cr の量を測定すること。

^{51}Cr 放出アッセイにおいて使用する標的細胞である継代培養細胞としては、好ましくは Daudi 細胞あるいは Raji 細胞を使用する。培養フラスコ中等で培養した標的細胞を遠心分離により集菌し、 $100\sim 150\mu\text{Ci}$ の ^{51}Cr -クロム酸ナトリウムを添加後、 $5\%\text{CO}_2$ 培養器にて 37°C において $1\sim 2$ 時間培養して ^{51}Cr で標識する。標的細胞の培養液としては、使用する細胞が増殖するために適したものを使用し、例えば RPMI 1640、F-12 などの培養液に血清、抗生物質などを適宜追加したものを使用する。

20 培養標的細胞を PBS により 3 回洗浄後、 $1\times 10^6/\text{ml}$ になるように培養液に懸濁しアッセイに使用する。

LAK 細胞を誘導するために、被験者の末梢血からリンパ球を分離する。被験者から採血した末梢血にヘパリンを加え、Ficoll-Conary 液 ($\text{s.g.}=1.077$) を用いた比重遠心分離法により界面の単核球を分離する。分離された単核球を PBS ($\text{pH } 7.4$ 、Ca および Mg を含まず) により $2\sim 3$ 回洗浄したのち、 $1\times 10^6/\text{ml}$ になるように培養液 (好ましくは、RPMI 1640 培地 (Gibco) に、FBS (非働化血清) や抗生物質などを適宜加えたもの) に懸濁する。これを、自己血清 (血漿) を 37°C 15 分処理してコートしたペトリ皿に移し、 37°C 1 時間培養する。非付着性細胞を回収して、リンパ球分画とする。

得られたリンパ球を上記培養液に所定の濃度で浮遊させる。このときの細胞浮

遊濃度は、 $1 \times 10^5 \sim 10^6 / \text{ml}$ に調節することが好ましい。

リンパ球浮遊液を調製した培養液と同じ培養液に、シイタケ菌糸体抽出物を最終濃度約 $1 \sim 100 \mu\text{g} / \text{ml}$ になるように加える。

5 培養プレートのウェルに、所定量のリンパ球浮遊液と抽出物含有培養液を入れる。このとき、無添加誘導コントロールとして、所定量のリンパ球浮遊液とシイタケ菌糸体抽出物を含まない培養液とを加えるウェルも用意する。次いで、培養プレートを炭酸ガス培養器中で3日間室温において静置し培養を行う。

例えば、96穴U底マイクロテストプレートを使用する場合には、各ウェルに、リンパ球浮遊液 $100 \mu\text{l}$ を添加することにより、細胞数が $1 \times 10^4 / \text{ウェル} \sim 1 \times 10^5 / \text{ウェル}$ となるようにすることが好ましい。1ウェル当たりの細胞数は、当業者が、ウェルの容量、LAK細胞の活性、標的細胞のLAK細胞に対する感受性などにより適宜定めることができる。

15 このようにして、被験者のリンパ球を種々の濃度（濃度ゼロを含む）の本発明のシイタケ菌糸体抽出物の存在下で培養しエフェクター細胞とする。本明細書においては、エフェクター細胞とは、3日間上記の培養処理を行った細胞を指し、LAK活性増強物質と共に培養されたリンパ球（LAK活性増強物質添加処理されたリンパ球）およびLAK活性増強物質を含まない培養液のみで培養されたリンパ球（無添加誘導処理されたリンパ球）の両方を含む。

20 培養後のリンパ球（エフェクター細胞）をウェルから回収し、再び新鮮な $10\% \text{ FBS}$ 添加 $\text{RPMI } 1640$ 培地に懸濁する（ $1 \times 10^6 / \text{ml}$ ）。

25 細胞傷害活性を測定するためのアッセイにおいては、標的細胞を分注した各ウェルに、実験解離用には上記の各種エフェクター細胞（LAK活性増強物質添加あるいは無添加誘導処理されたリンパ球） $1 \times 10^5 / \text{ml} \sim 1 \times 10^6 / \text{ml}$ を含有する浮遊液を所定量添加する。最大解離用にはエフェクター細胞浮遊液と同量の 1N-HCl を添加し、自然解離用にはエフェクター細胞浮遊液と同量の培養液を添加する。次いで、プレート遠心分離機等により、細胞を培養プレートのウェル底部に集めた後、 $5\% \text{ CO}_2$ 培養器にて 37°C において所定の時間（例えば、2～5時間）培養する。

培養終了後に、各ウェルの培養上清中に放出された ^{51}Cr による放射線量を測

定する。測定には、シンチレーションカウンターなどを使用できる。

ここで、最大解離とは、全標的細胞が破壊された場合に放出される ^{51}Cr の全量のことをいい、例えば、 1N-HCl を添加した培養液中で、エフェクター細胞を添加せずに、一定条件下、標的細胞を培養することにより溶解させ、培養上清中に放出された ^{51}Cr 量を測定することにより計測することができる。

実験解離とは、標的細胞に対してエフェクター細胞を添加した場合に、エフェクター細胞による標的細胞の細胞障害および標的細胞の自然死により放出される ^{51}Cr 量のことをいい、例えば、エフェクター細胞を添加した培養液中で、 1N-HCl を添加せずに、最大解離を求める場合と同様の条件下、標的細胞を培養することにより、培養上清中に放出された ^{51}Cr 量を測定することにより計測することができる。

自然解離とは、標的細胞の自然死により放出される ^{51}Cr 量のことをいい、例えば、 1N-HCl およびエフェクター細胞をともに添加せずに、最大解離を求める場合と同様の条件下で標的細胞を培養することにより、培養上清中に放出された ^{51}Cr 量を測定することにより計測できる。

LAK細胞の活性化の度合いは、以下の式(1)に従って算出したLAK活性値を指標として評価する。

$$\text{LAK 活性}\% = \frac{\text{実験解離 (cpm)} - \text{自然解離 (cpm)}}{\text{最大解離 (cpm)} - \text{自然解離 (cpm)}} \times 100 \quad \text{式 (1)}$$

20 本出願が主張する優先権の基礎となる出願である特願平10-353927号および特願平10-353928号の開示は、すべて引用により本明細書の中に取り込まれる。

実施例

本発明を以下の実施例によりさらに詳細に説明するが、これらはあくまで例示であって、本発明の範囲を限定するためのものではない。本発明の精神から逸脱

することなく、本発明に対する様々な変更あるいは修飾がなされてよいことは、当業者には理解される。

実施例 1：シイタケ菌糸体抽出物の調製

- 5 バカス 90 重量部、米糠 10 重量部からなる固体培地に純水を適度に含ませた後に、シイタケ種菌を接種し、温度および湿度を調節した培養室内に放置し、菌糸体を増殖させた。菌糸体が固体培地に密集した後、バカス基材の繊維素を解束し、12 メッシュ通過分が 24 重量%以下となるようにした。この解束された培地 1.0 kg に、純水 3.5 l および精製セルラーゼ 2.0 g を、固体培地を 4
10 0℃に保ちながら加えて培地含有混合物とした。

- 次いで、培地含有混合物を変速付ギヤーポンプにより循環させながら、固体培地にギヤー部分において粉碎および播潰作用を 200 分間程度加えて、バカス繊維の約 80 重量%が 12 メッシュ通過分となるようにした。培地含有混合物の粉碎および播潰は、該混合物の温度を徐々に上昇させながら実施した。その後、培
15 地含有混合物をさらに 90℃まで加熱して酵素を失活せしめると同時に滅菌して、90℃に 30 分間放置した。得られた培地含有混合液を 60 メッシュ濾布により濾過してシイタケ菌糸体抽出物とし、濃縮した後、凍結乾燥粉末を得た。

- このようにして得られたシイタケ菌糸体抽出物は、フェノール-硫酸法による糖質分析により糖質を 25.3% (重量/重量)、ローリー法によるタンパク質
20 分析によりタンパク質を 19.7% (重量/重量)、没食子酸を規準とする Folon-Denis 法によりポリフェノールを 2.6% (重量/重量) 含んでいた。シイタケ菌糸体抽出物は、その他に粗脂肪 8%、粗灰分 22%、糖質以外の可溶性無窒素物を約 20% 含んでいた。

また、シイタケ菌糸体抽出物の構成糖組成は以下のとおりであった。

- 25 Xyl : 15.2, Ara : 8.2, Man : 8.4, Gul : 39.4,
 Gal : 5.4, GlcN : 12.0, GLuUA : 11.3.

実施例 2：シイタケ菌糸体抽出物と IL-2 との LAK 活性の比較

実施例 1 で得られたシイタケ菌糸体抽出物を被験者から採取した末梢血に直接

添加した場合のLAK活性の増強効果をIL-2と比較した。

被験者Aから採血した末梢血にヘパリンを加え、Ficoll-Conary液(s.g.=1.077)を用いた比重遠心分離法により界面の単核球を分離した。分離された単核球をPBS(pH7.4、CaおよびMgを含まず)により2回洗浄したのち、
5 $1 \times 10^6 / \text{ml}$ になるように10%FBS(非働化血清)を加えたRPMI 1640培地(Gibco)に懸濁した。得られた細胞懸濁液を、自己血清(血漿)を37℃5分処理してコートしたペトリ皿に移し、37℃1時間培養後、非付着性細胞をリンパ球分画として回収した。

得られたリンパ球を10%FBS(非働化血清)を加えたRPMI 1640培地
10 (Gibco)に細胞濃度が $1 \times 10^6 / \text{ml}$ となるように浮遊させた。

10%FBS(非働化血清)を加えたRPMI 1640培地(Gibco)に、IL-2を最終濃度25U/ml、実施例1で得られたシイタケ菌糸体抽出物を最終濃度1、10、100および1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$ になるように加え、LAK活性増強物質含有液を調製した。

15 96穴U底マイクロテストプレートの各ウェルにリンパ球浮遊液100 μl とIL-2あるいは各濃度のシイタケ菌糸体抽出物を含むLAK活性増強物質含有液100 μl との合計200 μl ずつを入れた。無添加誘導コントロールとして、リンパ球浮遊液100 μl とシイタケ菌糸体抽出物を含まない培養液(10%FBS(非働化血清)を加えたRPMI 1640培地(Gibco))とを加えた。次い
20 で、培養プレートを炭酸ガス培養器中で3日間室温において静置し培養を行った。

培養後のリンパ球(エフェクター細胞)をウェルから回収し、 $1 \times 10^6 / \text{ml}$ の濃度で再び新鮮な10%FBS添加RPMI 1640培地に懸濁した。

標的細胞である継代培養細胞(Daudi 大日本製薬より入手)を10%FBS添加RPMI 1640培養液中で培養後、遠心分離により回収し、 10^6 細胞当たり100
25 $\sim 150 \mu\text{Ci}$ の ^{51}Cr -クロム酸ナトリウム(New England Nuclear)を添加し、5%CO₂培養器にて37℃において1時間培養した。 ^{51}Cr により標識された培養細胞をPBSにより3回洗浄後、 $1 \times 10^6 / \text{ml}$ になるように10%FBS添加RPMI 1640培養液中に懸濁した。

マイクロテストプレートの最大解離用、自然解離用、実験解離用の各ウェルに、

標識した標的細胞を $50 \mu\text{l}$ (5×10^4 /ウェル) ずつ分注した。さらに、最大解離用ウェルには 1N-HCl を $100 \mu\text{l}$ ずつ分注し、自然解離用ウェルには 10% FBS 添加 RPMI 1640 培養液を $100 \mu\text{l}$ ずつ分注した。そして実験解離用ウェルには 1、10、100 および $1000 \mu\text{g/ml}$ の濃度の本発明のシイタケ菌糸体抽出物、 25 U/ml の濃度の IL-2、または、こうした LAK 活性増強物質を含まない培養液により処理したエフェクター細胞を $100 \mu\text{l}$ ずつ分注した。この際、実験解離用、最大解離用、自然解離用の各ウェルがプレートの外周付近に位置しないようにした。

次いで、マイクロテストプレートを、プレート遠心分離機により 800 rpm で 5 分間遠心処理して細胞をウェル底部に集めた後、 $5\% \text{ CO}_2$ 培養器にて 37°C において 3.5 時間培養した。

培養後のプレートから SOKEN-PET Σ -96 にて各ウェルの培養上清を採取し、γシンチレーションカウンターにより放射活性を測定した。

上述した式 (1) に従って LAK 活性を算出した。

15 結果を表 1 並びに図 1 に示す。

表 1

実験番号	誘導物質	LAK 活性
1	なし	11%
2	IL-2 (最終濃度: 25 U/ml)	55%
3	シイタケ菌糸体抽出物 (最終濃度: $1 \mu\text{g/ml}$)	14%
4	シイタケ菌糸体抽出物 (最終濃度: $10 \mu\text{g/ml}$)	20%
5	シイタケ菌糸体抽出物 (最終濃度: $100 \mu\text{g/ml}$)	14%

なお、シイタケ菌糸体抽出物のリンパ球に対する毒性を調べるため、実施例 1 で得られたシイタケ菌糸体抽出物の最終濃度を 1 mg/ml として、上記と同様の方法でリンパ球を処理してから顕微鏡観察したところ、リンパ球はほぼ 100% 生存していた (結果は示さず)。

実施例3： シイタケ菌糸体抽出物のLAK活性至適濃度

シイタケ菌糸体抽出物を被験者から採取した末梢血に直接添加する場合の至適濃度を検討した。被験者BおよびCから採血した末梢血を用いて、実施例1で得られたシイタケ菌糸体抽出物の最終濃度を1、5、10および100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5 としたこと以外は、実施例2の方法と同様にしてLAK活性を算出した。

結果を表2並びに図2に示す。

表2並びに図2から明らかなように、本発明のシイタケ菌糸体抽出物は、最終濃度10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ あるいは50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ （リンパ球 10^6 個に対して10 μg あるいは50 μg を投与）で添加する場合において、もっとも高いLAK活性 10 を示すことがわかった。末梢血に対する投与量は、被験者の末梢血中のリンパ球の割合などにも影響されるが、おおよそ末梢血1mlに対して約10～25 μg あるいは50～125 μg のシイタケ菌糸体抽出物を添加することに相当する。

表2

実験番号	誘導物質	LAK活性	
		被験者B	被験者C
1	なし	13%	27%
2	シイタケ菌糸体抽出物（最終濃度：1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）	18%	28%
3	シイタケ菌糸体抽出物（最終濃度：5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）	19%	29%
4	シイタケ菌糸体抽出物（最終濃度：10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）	21%	34%
5	シイタケ菌糸体抽出物（最終濃度：50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）	19%	36%
6	シイタケ菌糸体抽出物（最終濃度：100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）	15%	30%

15 比較例1： クレスチンのLAK活性

本発明のシイタケ菌糸体抽出物と比較するために、免疫賦活剤であるクレスチンのLAK活性増強効果を検討した。被験者Dから採血した末梢血を用いて、最終濃度1 mg/ml のクレスチン（呉羽化学から入手）を用いたこと以外は、実施例2の方法と同様にして、クレスチンのLAK活性増強効果を評価した。

20 なお、最終濃度1 mg/ml は、クレスチンをLAK細胞誘導に用いた場合に、

最も効果的であると言われている濃度である。

結果を表3並びに図3に示す。

表3並びに図3から明かであるように、クレスチンは、その至適濃度である1 mg / mlであっても、LAK活性増強物質を含まない対照よりLAK増強活性
5 が低かった。

表3

実験番号	誘導物質	LAK活性
1	なし	14%
2	クレスチン（最終濃度：1 mg / ml）	13%

実施例4： シイタケ菌糸体抽出物含有製剤投与によるLAK活性の測定

被験者B、C、EおよびF各々に、実施例1と同様の方法で得られたシイタケ
10 菌糸体抽出物を含むLAK活性増強用製剤を投与し、LAK活性の増強効果を評価した。

このLAK活性増強用製剤は、製剤3 gあたりシイタケ菌糸体抽出物0.6 g
および乳糖2.4 gを含むものであり、一回6 g（シイタケ菌糸体抽出物として
1.2 g）を毎日3回、シイタケ菌糸体抽出物として合計3.6 g / 日、で1週
15 間投与した。服用開始前と最終投与の約2時間後に各被験者から末梢血を採血し、
実施例2と同様の方法でLAK活性を測定した。

結果を表4並びに図4に示す。

表4並びに図4から明らかなように、本発明のシイタケ菌糸体抽出物は、被験
者B、C、EおよびFにおいて、何れもLAK活性の著しい上昇を示した。

表4

被験者	LAK活性			
	B	C	E	F
シイタケ菌糸体抽出物服用前	13%	27%	14%	18%
シイタケ菌糸体抽出物服用後	40%	43%	18%	28%

また、シイタケ菌糸体抽出物の服用による副作用を検査するために、被験者B、CおよびEに対して血液生化学検査を実施した。その結果を表5に示す。なお、シイタケ菌糸体抽出物服用期間中、被験者B、C、EおよびFには、全身倦怠、悪寒、発熱、消化器症状等の副作用は認められなかった。

- 5 表5からも明らかなように、本発明のシイタケ菌糸体抽出物の服用による副作用は認められなかった。

表 5

	被験者 B		被験者 C		被験者 E	
	服用前	1 週間服用後	服用前	1 週間服用後	服用前	1 週間服用後
WBC($\times 10^4/\mu\text{L}$)	5.45	5.94	5.85	5.08	8.01	7.47
RBC($\times 10^4/\mu\text{L}$)	4.56	4.61	4.99	4.85	4.89	4.65
Hb (g/dL)	14.2	14.2	14.4	13.8	15.5	14.8
Ht (%)	42.2	42.8	43.6	42.1	44.8	42.9
MCV(fL)	92.5	92.8	87.4	86.8	91.6	92.3
MCH(pg)	31.1	30.8	28.9	28.5	31.7	31.8
MCHC(g/dL)	33.6	33.2	33.0	32.8	34.5	34.5
PLT($\times 10^4/\mu\text{L}$)	19.1	18.5	23.9	19.3	29.2	29.7
RDW-SD(fL)	43.7	44.6	43.5	43.6	43.7	44.8
RDW-CV(%)	12.8	13.0	13.4	13.6	13.0	13.3
PDW(fL)	14.0	13.4	11.6	12.6	13.3	13.2
MPV(fL)	11.1	10.9	10.0	10.2	10.6	10.4
P-LCR(%)	34.1	32.5	24.9	27.6	30.1	28.8
Stab	0.5	0.5	1.0	0.0	0.5	0.0
Seg	54.0	48.5	56.0	43.5	46.5	38.5
Lym	37.5	40.5	38.0	45.5	28.5	35.0
Mono	4.5	7.5	3.0	9.5	11.5	8.5
Eo	2.5	3.0	1.5	1.0	12.0	15.5
Baso	1.0	0.0	0.5	0.5	0.5	0.5
TP(g/dL)	6.6	6.9	7.7	7.5	8.0	7.7
ALB(g/dL)	3.9	4.1	4.4	4.3	4.8	4.7
A/G	1.44	1.46	1.33	1.34	1.50	1.57
TTT(SHU)	3.9	5.0	8.0	8.1	5.3	3.0
ZTT(Kunk)	8.6	8.4	12.6	12.4	6.3	4.9
U-N(mg/dL)	10.4	10.3	10.2	11.2	11.8	11.6
U-A(mg/dL)	5.6	5.9	5.4	5.2	6.1	5.9
クレアチニン(mg/dL)	0.67	0.71	0.84	0.82	0.67	0.72
総BIL(mg/dL)	0.6	0.7	0.5	0.6	0.5	0.5
直接BIL(mg/dL)	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1
間接BIL(mg/dL)	0.5	0.6	0.5	0.6	0.4	0.4
GLU(mg/dL)	124	104	94	111	115	114
AST(GOT)(IU/L)	15	13	18	16	33	33
ALT(GPT)(IU/L)	29	30	20	20	45	57
LD(LDH)(IU/L)	142	139	171	152	380	343
CK(CPK)(IU/L)	121	131	227	177	317	224
ALP(IU/L)	131	136	156	148	174	162
γ -GT(IU/L)	12	14	23	23	225	240
LAP(IU/L)	45	40	80	73	134	120
CHE(IU/L)	2358	2593	2779	2749	3191	3299
AMY(IU/L)	78	87	107	93	59	54
T-CHO(mg/dL)	208	232	206	200	255	243
HDLCHO(mg/dL)	50	50	44	40	47	47
T-G(mg/dL)	135	210	270	303	451	359
Na(mEq/L)	141	142	140	141	139	141
K(mEq/L)	3.7	3.9	4.1	3.8	4.0	4.2
Cl(mEq/L)	106	107	105	107	103	104
Ca(mEq/L)	4.4	4.4	4.6	4.4	4.9	4.7
I-P(mg/dL)	3.3	3.1	3.0	2.7	3.5	3.2
H	0	0	0	0	1	0
L	0	0	0	1	1	0
I	0	1	1	1	1	1
RAテスト	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CRP(mg/dL)	0.03	0.06	0.02	0.01	0.07	0.12
ANA	<40	<40	<40	<40	<40	<40
ANAパターン	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CH50(CH50/mL)	33.0	33.0	45.0	42.0	53.0	52.0

産業上の利用性

本発明のシイタケ菌糸体抽出物を含むLAK増強物質は、末梢血直接添加に際してIL-2と同様の効果を示し、かつ、リンパ球に対する直接毒性はなかった。また、IL-2に比較してはるかに安価に入手可能である。したがって、副作用が強くかつ高価なIL-2に代えて、LAK療法に利用することができる。

また、本発明のシイタケ菌糸体抽出物含有製剤は、直接投与によってもLAK活性を著しく上昇させることができ、かつ、副作用は認められなかった。したがって、本発明のシイタケ菌糸体抽出物を含む製剤は、LAK療法を実施することなく、直接投与、例えば、経口投与により、ほとんど副作用なくLAK活性を上昇させることができ、免疫活性化剤として有用である。

請求の範囲

1. シイタケ菌糸体抽出物を含有するLAK活性増強物質。
2. 末梢血由来のリンパ球に作用させることによりLAK活性を増強させる、
- 5 請求項1記載のLAK活性増強物質。
3. シイタケ菌糸体抽出物の濃度がリンパ球 10^6 個に対して $1\mu\text{g}$ 以上である、請求項2記載のLAK活性増強物質。
4. 請求項1記載のLAK活性増強物質を含有するLAK活性増強用製剤。
5. 請求項1記載のLAK活性増強物質および薬学上許容可能な担体を含有する、
- 10 医薬または獣医薬用のLAK活性増強用製剤。
6. 経口投与用である、請求項4または5記載のLAK活性増強用製剤。
7. 食品、飲料、または飼料である、請求項4記載のLAK活性増強用製剤。
8. 注射または経皮投与用である、請求項4または5記載のLAK活性増強用製剤。
- 15 9. 腫瘍および／または癌の治療に用いる、請求項4乃至8の何れか1項記載のLAK活性増強用製剤。
10. 請求項4乃至8の何れか1項記載のLAK活性増強用製剤の有効量を投与する、腫瘍および／または癌の治療方法。
11. 腫瘍および／または癌の治療に用いる医薬品を得るための、請求項1記
- 20 載のLAK活性増強物質の使用。



図 1

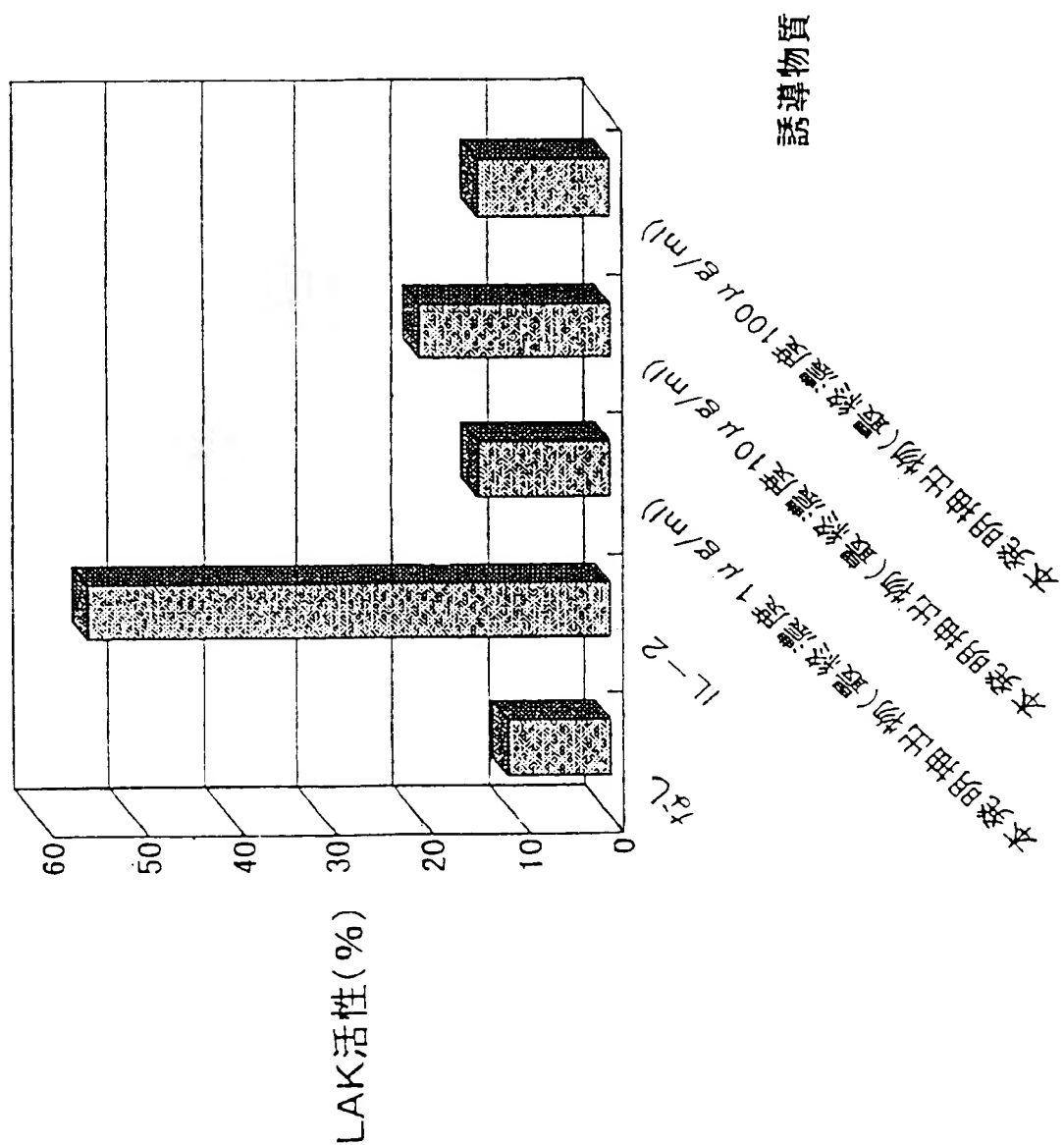




図 2

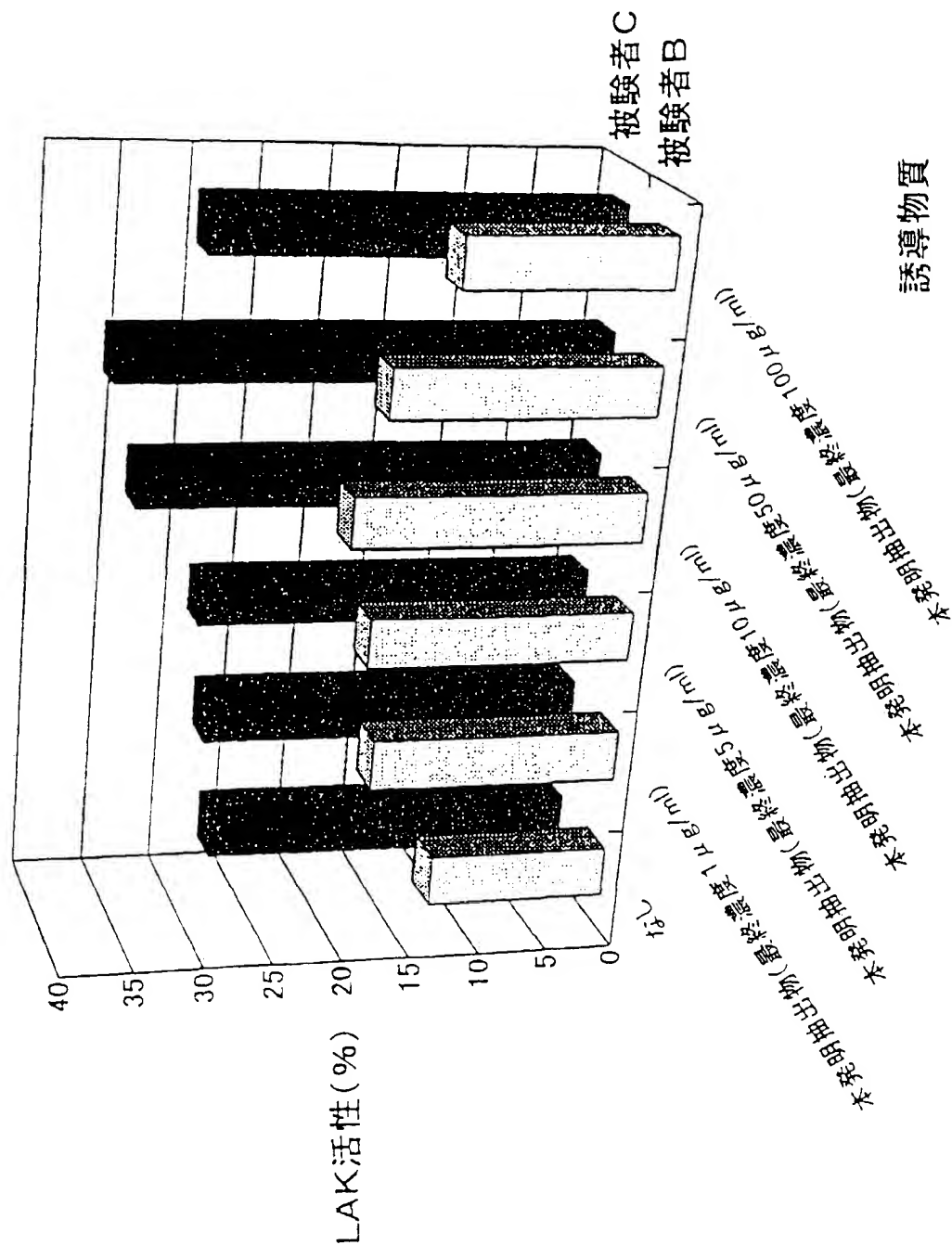




図 3

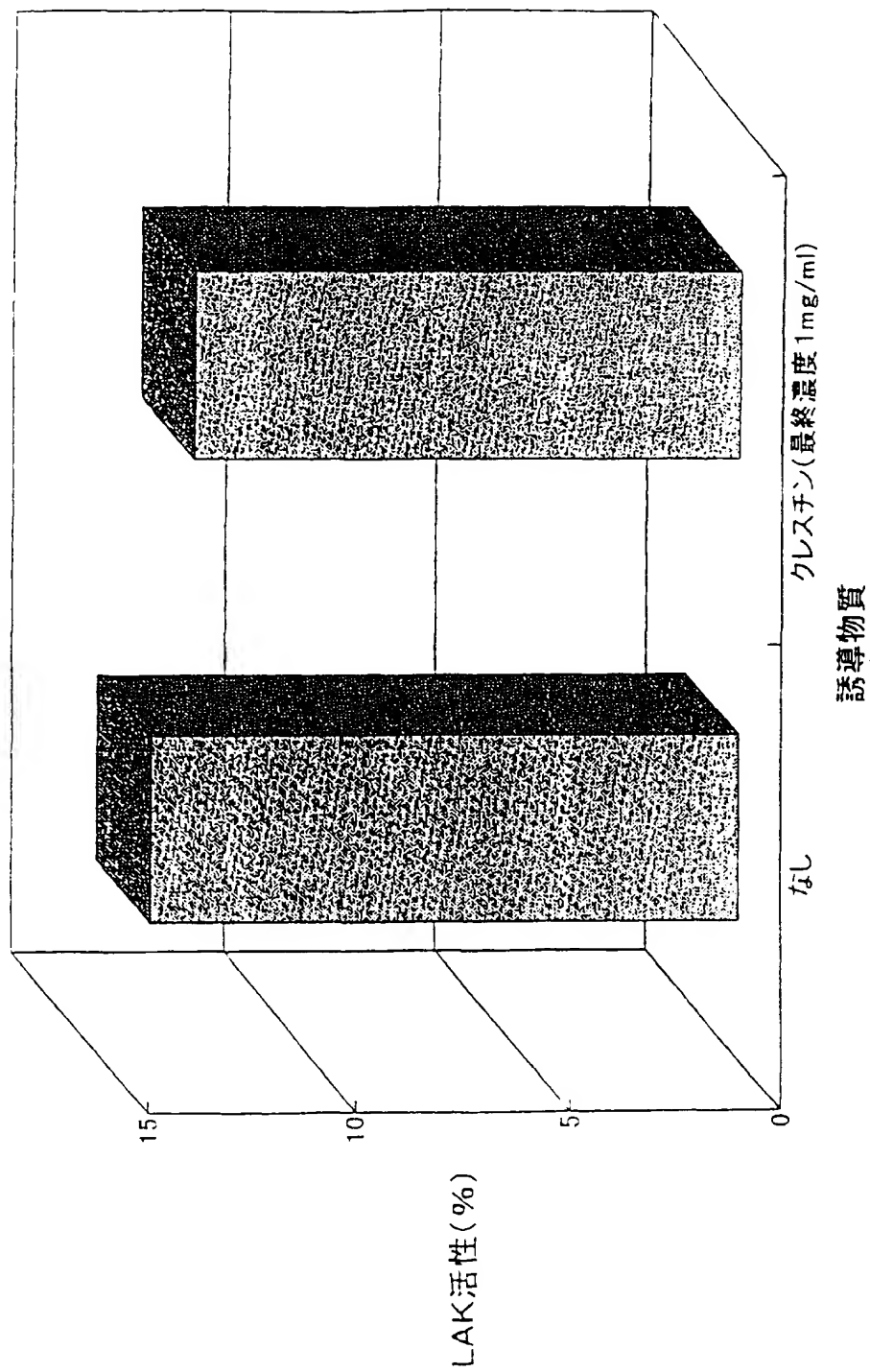
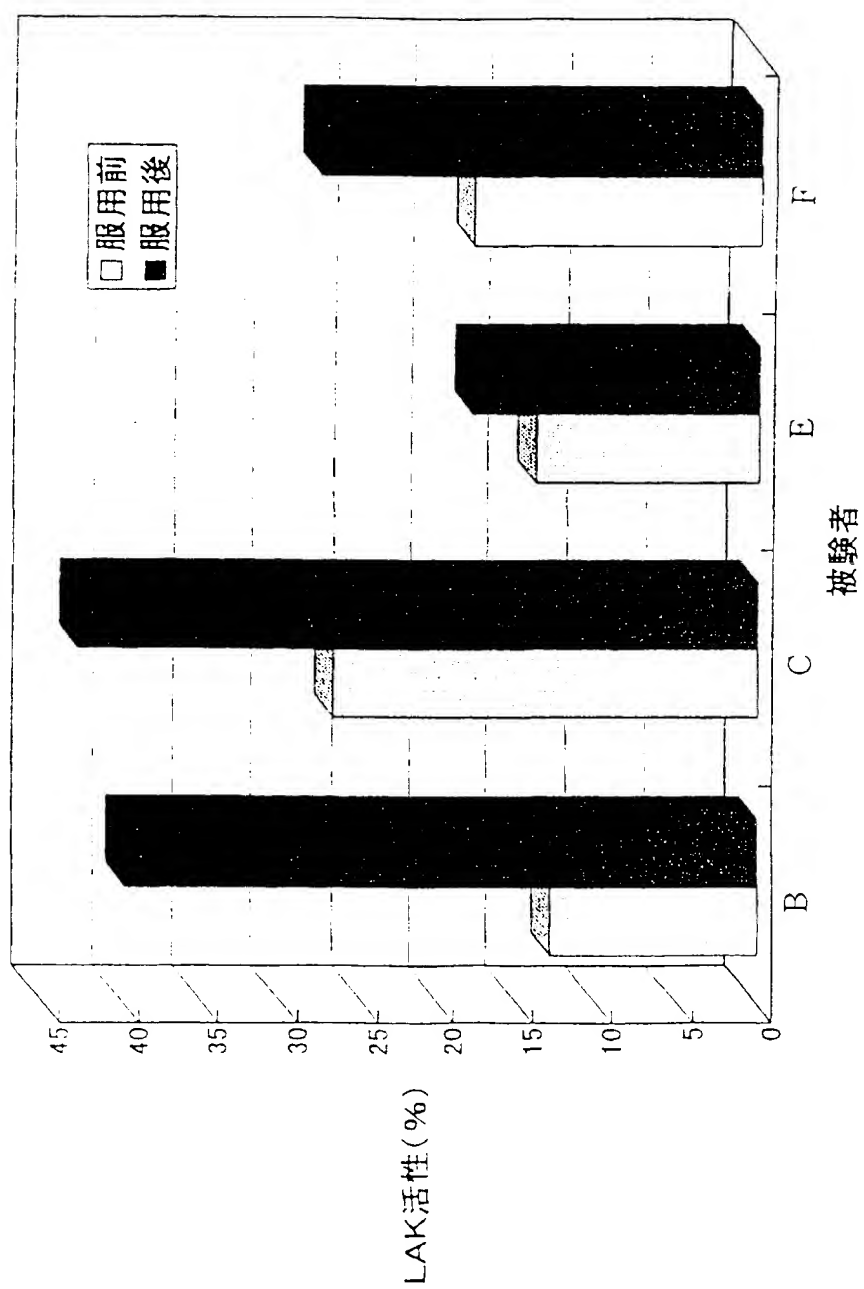




図 4





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06616

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K35/84, A61P35/00, A61P37/04//A23L1/212
A23L1/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K35/84, A61P35/00, A61P37/04//A23L1/212
A23L1/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ANTICANCER RESEACH, vol.13, no.5C, p1773-1776, 1993 "Augmentation of Lymaphpkine-Activated Killer Cell Activity by Lentinan" Masaji Tani et al ,p1776	1-9,11
Y	INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOPHACOLOGY, vol.14, no.4, p. 535-539, 1992 "Enhanced Induction of Lymphokine-Activated Killer Activity After Lentinan Administration in Patients with Gastric Carcinoma" Shinya Arinaga et al, See page 535, right column, lines 1-3	1-9,11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
04 February, 2000 (04.02.00)

Date of mailing of the international search report
15 February, 2000 (15.02.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06616

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The subject matter of claim 10 relates to a method for treatment of the human body by therapy or operation, which does not require an international search report by this International Search Authority. (PCT Article 17(2) (a)(i) and Rule 39.1(iv)).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K35/84, A61P35/00, A61P37/04, A23L1/212
A23L1/28

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K35/84, A61P35/00, A61P37/04, A23L1/212
A23L1/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	ANTICANCER RESEACH, vol. 13, no. 5C, p1773-1776, 1993 "Augmentati on of Lymphokine-Activated Killer Cell Activity by Lentinan " Masaji Tanii et al, p1776参照	1-9, 11
X	INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOPHARMACOLOGY, vol. 14, no. 4, p53 5-539, 1992 "Enhanced Induction of Lymphokine-Activated Kille r Activity After Lentinan Administration in Patients with Gastric Carcinoma" Shinya Arinaga et al, p535 右欄1-3行参照	1-9, 11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.02.00

国際調査報告の発送日

15.02.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鶴見 秀紀

印

4C18415

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 10 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求項10は、治療による人体の処置方法に関するものであるから、国際調査機関が国際調査することを要しないものである。(PCT規則. 39. 1 (iv))

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06616

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K35/84, A61P35/00, A61P37/04//A23L1/212
A23L1/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K35/84, A61P35/00, A61P37/04//A23L1/212
A23L1/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN) , MEDLINE (STN) , BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ANTICANCER RESEACH, vol.13, no.5C, p1773-1776, 1993 "Augmentation of Lymaphpkine-Activated Killer Cell Activity by Lentinan" Masaji Tani et al ,p1776	1-9,11
Y	INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOPHACOLOGY, vol.14, no.4, p. 535-539, 1992 "Enhanced Induction of Lymphokine-Activated Killer Activity After Lentinan Administration in Patients with Gastric Carcinoma" Shinya Arinaga et al, See page 535, right column, lines 1-3	1-9,11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
04 February, 2000 (04.02.00)

Date of mailing of the international search report
15 February, 2000 (15.02.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06616

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The subject matter of claim 10 relates to a method for treatment of the human body by therapy or operation, which does not require an international search report by this International Search Authority. (PCT Article 17(2) (a)(i) and Rule 39.1(iv)).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

4T
Translation

Applicant's or agent's file reference YCT-455	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/06616	International filing date (<i>day month year</i>) 26 November 1999 (26.11.99)	Priority date (<i>day month year</i>) 27 November 1998 (27.11.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 38 84, A61P 37 04, A23L 1 212, 1 28		
Applicant KOBAYASHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.		

- This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
- This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
 These annexes consist of a total of _____ sheets.
- This report contains indications relating to the following items:
 - ☒ Basis of the report
 - ☐ Priority
 - ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
 - ☐ Lack of unity of invention
 - ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement
 - ☐ Certain documents cited
 - ☐ Certain defects in the international application
 - ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 26 November 1999 (26.11.99)	Date of completion of this report 16 August 2000 (16.08.2000)
Name and mailing address of the IPEA JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/06616

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/06616

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 10

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 10 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

See supplemental sheet for continuation of Box III. 1.

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 10

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP 99/06616

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III. 1.

Claim 10 pertains to treatment of the human body by surgery or therapy and thus relates to a subject matter that does not require preliminary examination by this International Preliminary Examination Authority, under the provisions of PCT Article 34(4)(a)(i) and PCT Rule 67.1(iv).



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No
PCT/JP 99/06616

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1 Statement

Novelty (N)	Claims	1-9, 11	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-9, 11	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-9, 11	YES
	Claims		NO

2 Citations and explanations

Claims 1-9 and 11 do not involve an inventive step in the light of Documents 1 and 2 below. Documents 1 and 2 indicate that extracts of shiitake mushroom hyphae potentiate the activity of killer T cells and NK cells. Therefore, use of a shiitake mushroom hyphal extract as a potentiator of LAK cells, which include both killer T-cells and NK cells, would be obvious to a person skilled in the art.

Claims 1-9 and 11 are industrially applicable.

Document 1: JP, 62-270532, A (Noda Shokukin Kogyo KK), November 24, 1987 (24.11.87) (Family: none)

Document 2: Yoshiki Yamamoto et al., "Immunopotentiating activity of the water-soluble lignin-rich fraction prepared from LEM: The extract of the solid culture medium of *Lentinus edodes* mycelia", Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, Vol. 61, No. 11, pp. 1909-1912, 1997



REC'D 04 SEP 2000

WIPO PCT

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)

(PCT36条及びPCT規則70)

出願人又は代理人 の書類記号 YCT-455	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P99/06616	国際出願日 (日.月.年) 26.11.99	優先日 (日.月.年) 27.11.98
国際特許分類(IPC) Int. Cl. A61K38/84, A61P37/04//A23L1/212 A23L1/28		
出願人(氏名又は名称) 小林製薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。

☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。

(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)

この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I ☒ 国際予備審査報告の基礎II ☐ 優先権III ☒ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成IV ☐ 発明の単一性の欠如V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明VI ☐ ある種の引用文献VII ☐ 国際出願の不備VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 26.11.99	国際予備審査報告を作成した日 16.08.00	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 鶴見 秀紀 電話番号 03-3581-1101 内線 3452	4C 8415



I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ、 図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ、 図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ、 図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)



Ⅲ. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

1. 次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

☐ 国際出願全体

☒ 請求の範囲 10

理由：

☒ この国際出願又は請求の範囲 10 は、国際予備審査をすることを要しない次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

請求項 10 は手術または治療による人体の処置方法を包含するものであるもので、PCT 第 34 条(4)(a)(i) 及び PCT 規則 67.1(iv) の規定により、この予備審査機関が予備審査することを要しないものである。

☐ 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

☐ 全部の請求の範囲又は請求の範囲 が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

☒ 請求の範囲 10 について、国際調査報告が作成されていない。

2. スクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書 C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、有効な国際予備審査をすることができない。

☐ 書面による配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

☐ フランキンブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-9, 11	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-9, 11	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-9, 11	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求項1-9、11は、下記文献1、2により進歩性を有しない。下記文献1、2には椎茸菌糸体抽出物がキラーT細胞及びNK細胞の活性を増強させることが記載されているので、キラーT細胞系やNK細胞系を有するLAK細胞の活性増強物質として椎茸菌糸体抽出物を用いることは、当業者によれば自明である。

請求項1-9、11は、産業上の利用可能性を有する。

文献1. JP, 62-270532, A(野田食菌工業株式会社)24. 11月. 1987(24. 11. 87) ファミリーなし

文献2. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, vol. 61, no. 11, p1909-1912
1997 "Immunopotentiating activity of the water-soluble lignin rich fraction prepared from LEM: The extract of the solid culture medium of *Lentinus edodes* mycelia" Yamamoto Yoshiki et al



PCT REQUEST

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	26.11.99
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form - PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared using	PCT-EASY Version 2.90 (updated 15.10.1999)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	Japanese Patent Office (RO/JP)
0-7	Applicant's or agent's file reference	YCT-455
I	Title of invention	LAK ACTIVITY ENHANCERS DERIVED FROM EXTRACT OF LENTINUS EDODES MYCELIUM AND LAK ACTIVITY-ENHANCING FORMULATIONS CONTAINING THE EXTRACT
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	KOBAYASHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.
II-5	Address:	4-3-6, Doshomachi, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 541-8507 Japan
II-6	State of nationality	JP
II-7	State of residence	JP
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is:	applicant only
III-1-2	Applicant for	all designated States except US
III-1-4	Name (LAST, First)	NAGAOKA, Hitoshi
III-1-5	Address:	22-13, Kotobuki 2-chome, Abiko-shi, Chiba 270-1152 Japan
III-1-6	State of nationality	JP
III-1-7	State of residence	JP



PCT REQUEST

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is:	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	ASANO, Kenji
III-2-5	Address:	c/o Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd. 3-13-35, Mitsuya Minami, Yodogawa-ku, Osaka-shi, Osaka 532-0035 Japan
III-2-6	State of nationality	JP
III-2-7	State of residence	JP
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is:	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	MATSUDA, Yukiko
III-3-5	Address:	c/o Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd. 3-13-35, Mitsuya Minami, Yodogawa-ku, Osaka-shi, Osaka 532-0035 Japan
III-3-6	State of nationality	JP
III-3-7	State of residence	JP
III-4	Applicant and/or inventor	
III-4-1	This person is:	applicant and inventor
III-4-2	Applicant for	US only
III-4-4	Name (LAST, First)	TAJIMA, Yutaka
III-4-5	Address:	10-511, Yaemizo 3-chome, Saga-shi, Saga 849-0935 Japan
III-4-6	State of nationality	JP
III-4-7	State of residence	JP
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence	
	The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	SHAMOTO, Ichio
IV-1-2	Address:	YUASA AND HARA Section 206, New Ohtemachi Bldg, 2-1, Ohtemachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0004 Japan
IV-1-3	Telephone No.	03-3270-6641
IV-1-4	Facsimile No.	03-3246-0233
IV-1-5	e-mail	yulawpat@yuasa-hara.co.jp



PCT REQUEST

IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as first named agent	
IV-2-1	Name(s)	IMAI, Shosuke; MASUI, Chuji; KURITA, Tadahiko; KOBAYASHI, Yasushi; TOMITA, Hiroyuki	
V	Designation of States		
V-1	Regional Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	--	
V-2	National Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	CA CN GB KR SG US	
V-5	Precautionary Designation Statement In addition to the designations made under items V-1, V-2 and V-3, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) of the State(s) indicated under item V-6 below. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit.		
V-6	Exclusion(s) from precautionary designations	NONE	
VI-1	Priority claim of earlier national application		
VI-1-1	Filing date	27 November 1998 (27.11.1998)	
VI-1-2	Number	353927 /1998	
VI-1-3	Country	JP	
VI-2	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1	
VII-1	International Searching Authority Chosen	Japanese Patent Office (JPO) (ISA/JP)	
VIII	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
VIII-1	Request	5	-
VIII-2	Description	20	-
VIII-3	Claims	1	-
VIII-4	Abstract	1	-
VIII-5	Drawings	4	-
VIII-7	TOTAL	31	
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
VIII-8	Fee calculation sheet	✓	-
VIII-16	PCT-EASY diskette	-	diskette
VIII-18	Figure of the drawings which should accompany the abstract	4	
VIII-19	Language of filing of the international application	Japanese	



PCT REQUEST

IX-1	Signature of applicant or agent	
IX-1-1	Name (LAST, First)	SHAMOTO, Ichio (seal)
IX-2	Signature of applicant or agent	
IX-2-1	Name (LAST, First)	IMAI, Shosuke (seal)
IX-3	Signature of applicant or agent	
IX-3-1	Name (LAST, First)	MASUI, Chuji (seal)
IX-4	Signature of applicant or agent	
IX-4-1	Name (LAST, First)	KURITA, Tadahiko (seal)
IX-5	Signature of applicant or agent	
IX-5-1	Name (LAST, First)	KOBAYASHI, Yasushi (seal)
IX-6	Signature of applicant or agent	
IX-6-1	Name (LAST, First)	TOMITA , Hiroyuki (seal)

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/JP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

